云 南 植 物 研 究 2001, 23 (2): 239~242
Acta Botanica Yunnanica

使君子科风车子亚科核糖体 DNA ITS 区序列分析及系统学意义*

谈凤笑[1]，施苏华**[1]，黄椰林[1]，杜雅青[1]，王玉国[1]，龚 洵[1,2]
(1 中山大学生命科学学院，广东 广州 510275；2 中国科学院昆明植物研究所，云南 昆明 650204)

Analysis of nrDNA ITS Sequences in the Subfamily Combretoideae (Combretaceae) and Its Systematic Significance

TAN Feng - Xiao[1], SHI Su - Hua[1], HUANG Ye - Lin[1], DU Ya - Qing[1], WANG Yu - Guo[1], GONG Xun[1,2]
(1 *School of Life Sciences*, *Zhongshan University*, Guangzhou 510275, China;
2 *Kunming Institute of Botany*, *Chinese Academy of Sciences*, Kunming 650204, China)

Key words: Combretaceae; Combretoideae; Phylogeny; ITS regions; nrDNA
关键词：使君子科；风车子亚科；系统发育；ITS 区；核糖体 DNA
中图分类号：Q 949，Q 75 **文献标识码**：A **文章编号**：0253 - 2700(2001)02 - 0239 - 04

使君子科（Combretaceae）主要分布于热带非洲和亚洲，美洲和澳洲也有少量分布。全世界有约20属，近500多种（Exell & Stace，1966）。我国有6属约25种，均分布于长江以南各省区，主产云南及海南岛（徐廷志，1984）。其中，除使君子属（*Quisqualis*）仅有2种外，榄仁树属（*Terminalia*）和风车子属（*Combretum*）是全科最大的两属，榆绿木属（*Anogeissus*）在我国只有一种，它是我国北热带季节性雨林中的建群树种之一（傅立国，1992），萼翅藤属（*Calycopteris*）则为亚洲热带山地特有的单种属（傅立国，1992），而榄李属（*Lumnizera*）是构成热带海岸红树林的成分之一，具有重要的生态学意义。

该科自建立以来，科内的分类问题上一直较为混乱（De Candolle，1828；Engler & Diels，1899；Exell，1931；Exell & Stace，1966）。在 De Candolle（1828）的系统中，使君子科仅分为榄仁族 Terminalieae 和风车子族 Combreteae 2 个族。Engler & Diels（1899）及 Exell（1931）将使君子科分成 Strephonematoideae 亚科和风车子亚科 Combretoideae，后者又被划分为 4 个族：1）风车子族，含风车子属和使君子属等 6 属；2）榄仁族，包括榄仁树属和榆绿木属等 6 属；3）萼翅藤族 Calycopterideae，仅萼翅藤一属；4）Laguncularieae 族，含榄李属等 3 属。Exell & Stace（1966）又根据形态学和解剖学特征，提出了一个新的分类系统，

* 基金项目：国家杰出青年科学基金（39825104），国家自然科学基金（30070053）、广东省自然科学基金（001223）、教育部高等学校骨干教师资助计划资助项目.
** 通讯作者 E - mail: lsssh@zsu. edu. cn
收稿日期：2001 - 01 - 17，2001 - 03 - 05 接受发表

认为除了作为红树林成分的榄李属所在的Laguncularieae族应予保留外，风车子亚科中Laguncularieae族以外的其余3个族应合并为一个族——风车子族。尽管近年来在形态解剖学(Rajput等，1999)、孢粉学（El Ghazlai等，1998)、细胞学（Ohri，1996)、植物化学(Collins等，1992）及分子系统学（Conti等，1996）等方面进行了大量的研究，但迄今为止各系统均未得到很好的检验，利用DNA序列对使君子科进行系统学研究尚未见报道。由于Engler和Diels系统风车子亚科的所有4个族我国均有代表属，因此本研究采用直接PCR测序方法，对我国使君子科全部6属植物核糖体DNA ITS区（包括5.8S编码区）的序列进行了分析，旨在通过研究中国使君子科植物的分子系统发育，对使君子科风车子亚科内的系统关系进行探讨，并为深入研究各属间亲缘关系提供更为详实的分子证据。

1　材料和方法

1.1　材料来源

实验材料包括了中国分布的使君子科6属13种14个样品。基于现有的分子数据——叶绿体rbcL基因序列数据构建的系统树（Conti等，1996）和APG系统（APG，1998)，本研究选择了千屈菜科（Lythraceae）的千屈菜 *Lythrum salicaria* 和柳叶菜科（Onagraceae）的草龙 *Ludwigia hyssopifolia* 作为复合外类群。具体的材料种类及来源见表1。

表1　本研究所用使君子科与外类群的样品来源

Table 1　Accessions of Combretaceae and outgroups sampled in this study.

Species		Voucher*	Collection Source	GenBank Acc. No.
阿娜树	*Anogeissus leiocarpus*	Huang S. 9942103	Jianfengling, Hainan	AF334766
榆绿木	*Anogeissus acuminata* var. *lanceolata*	Zhang 99111501	Yingjiang, Yunnan	AF334765
萼翅藤	*Calycopteris floribunda*	Gong 200052301	Yingjiang, Yunnan	AF334770
风车子	*Combretum alfredii*	Tang 99031504	Lipu, Guangxi	AF160471
石风车子	*Combretum wallichii*	Shi 990703005	Kunming Botanical Garden, Yunnan	AF208731
红榄李	*Lumnitzera littorea*	Chen 990601	Dongzaigang, Hainan	AF160468
榄李	*Lumnitzera racemosa*	Huang 99050301	Dongzaigang, Hainan	AF160467
小花使君子	*Quisqualis caudata*	Huang 98121212	Xishuangbanna, Yunnan	AF160469
使君子	*Quisqualis indica*	Tang 99031505	Lingchuan, Guangxi	AF160470
毗黎勒	*Terminalia bellirica*	Huang 98121216	Kunming Botanical Garden, Yunnan	AF334768
诃子	*Terminalia chebula*	Huang 9942102	Jianfengling, Hainan	AF334769
海南榄仁	*Terminalia hainanensis*	Ye 99031303	Campus of Zhongshan Uni., Guangdong	AF160466
木勒榄仁	*Terminalia muelleri* (1)	Liao 990308035	Jianfengling, Hainan	AF160472
木勒榄仁	*Terminalia muelleri* (2)	Huang 98121215	Kunming Botanical Garden, Yunnan	AF334767
草龙	*Ludwigia hyssopifolia***	Yuan 200072401	Campus of Zhongshan Uni., Guangdong	AF334771
千屈菜	*Lythrum salicaria***	Lei 05	Wuhan Botanical Garden, Wuhan	AF334772

*　凭证标本存中山大学植物标本馆　　**　外类群

*　Voucher specimens are stored in SYS (Zhongshan University)　　**　outgroup

1.2　实验方法

1.2.1　总DNA的提取、纯化，PCR扩增，ITS测序

采用改进了的CTAB法（Doyle等，1987）提取总DNA，用玻璃粉法对总DNA进行纯化。以ITS4和ITS5作引物，按程序（94℃ 4 min；94℃ 1 min，50℃ 1 min，72℃ 1 min，30

个循环；72℃ 5 min）进行PCR扩增，得到核糖体DNA的ITS片段（包括ITS-1，5.8S和ITS-2）。PCR反应产物用QIAquick PCR purification kit进行纯化。PCR纯化产物经Sequenase Version 2.0 DNA sequencing kit，以α-^{35}S-dATP放射性同位素标记，分别以N18L18（5'AAG TCG TAA CAA GGT TTC 3'）、ITS4为测序引物进行手工测序（具体操作见Shi等，1998）。部分样品采用377型自动测序仪（Applied Biosystems，CA）进行测序（北京农业大学）。

1.2.2　数据分析

所测定的使君子科6属13种植物（14个样品）的核糖体DNA ITS1，5.8S，和ITS2区核苷酸序列（607－613bp）已在GenBank注册，注册号见表1。测得的ITS序列数据用ClustalX程序（Thompson等，1997）进行对位排列。用PAUP4.0软件包（Swofford，1999）对序列进行统计和分支分析，计算各类群间的核苷酸差异数及差异较正值（Knuc值）。采用最大简约法（maximum parsimony method）获得最大简约树（MPTs）；应用自展法（bootstrap）检验系统树，自展次数为1000次。

2　结果与讨论

排序后的ITS序列总长度为658，其中变异位点为395，信息位点为254。ITS数据分析所得的最大简约树见图1。树的总长度为860，CI值为0.7558，RI值为0.7283，RC值为

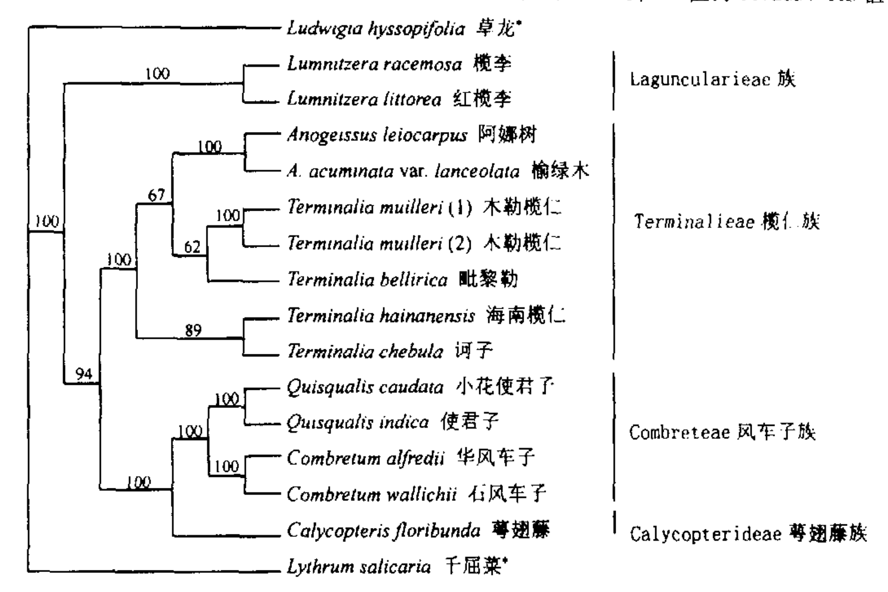


图1　车子亚科的ITS最大简约树（数字代表各分支的自展数据支持率；＊表示外类群）

Fig.1　The single most parsimonious tree of Combretoideae based on ITS regions (lenth = 860, CI = 0.7558, RI = 0.7283, HI = 0.2442, RC = 0.5505). Gaps were treated as missing data. Values above branches are bootstrap supports (%) for the clades. Asterisk (＊) indicates outgroup.

0.5505。ITS系统树表明，风车子亚科中的4个族（Engler和Diels，1899）分成2支演化：最基出的一支由红树林成分榄李属所在的Laguncularieae族单独构成；另一支由风车子族、萼翅藤族和榄仁族共同组成。这一支又分为二支，榄仁族的榄仁树属与榆绿木属组成一单系分支，榄仁族内部呈复系演化特征：在榄仁树属内，木勒榄仁（*T. mulleri*）与毗黎勒（*T. bellirica*）构成一支，两者与榆绿木属呈平行关系，海南榄仁（*T. hainanensis*）与诃子（*T. chebula*）则构成榄仁族最外部的分支。因此，ITS证据支持榄仁树属与榆绿木属有较近的亲缘关系，但由于两者在形态学上的差异较大，进一步的深入研究，特别是利用不同的基因序列探讨榄仁树属内的系统发育关系很有必要；与榄仁族平行演化的另一支由风车子族和萼翅藤族组成，表明这两者的关系密切。在风车子族内使君子属与风车属各自独立为一支，尽管这两者形态与解剖学等方面特征较相近（Exell，1931；Exell & Stace，1966），但ITS结果表明两属分别作为一个单独的类群是成立的。从本文结果分析看，Exell & Stace（1966）将风车子族、萼翅藤族和榄仁族合并为一个族的处理比较合理。

致谢：承中山大学叶创兴教授、廖文波博士，广西师范大学唐绍清博士，海南大学黄世满先生，海南热作学院陈守才先生，美国哈佛大学标本馆David E. Boufford博士提供部分实验材料和参考资料。

〔参考文献〕

徐廷志，1984. 中国植物志第53卷第1分册［M］. 北京：科学出版社，1-28

傅立国，1992. 中国植物红皮书第1册［M］. 北京：科学出版社，220-227

Angiosperm Phylogeny Group, 1998. An ordinal classification for the families of flowering plants［J］. *Ann Missouri Bot Gard*, **85**: 531-553

Collins D J, Pilotti C A, Wallis A F A, 1992. Triterpene acids from some Papua New Guinea Terminalia species［J］. *Phytochemistry*, **31** (3): 881-884

Conti E, Litt A, Sytsma K J, 1996. Circumscription of myrtales and other relationships to other rosids: evidence from rbcL sequence data［J］. *J Bot*, **83** (2): 221-233

De Candolle, A P, 1828. Memoire sur la famille des Combretacees［M］. Geneva: Barbezat et Delarue

Doyle J J, Doyle J L, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue［J］. *Phytochem Bull*, **19**: 11-15

El Ghazlai G E B, *et al*, 1998. Combretaceae. In: R. Brown［J］. *World Pollen and Spore Flora*, **21**: 1-40

Engler A, Diels L, 1899. Monographieen Afrikanischer Pflanzen - Familien und Gattungen, Ⅲ&Ⅳ: Combretaceae［M］. Leipzig: Engelmann

Exell A W, 1931. The genera of Combretaceae［J］. *J Bot*, **69**: 113-128

Exell A W, Stace C A, 1966. Revision of the Combretaceae［J］. *Bol Soc Brot*, ser 2, **40**: 5-26

Ohri D, 1996. Genome size and polyploidy variation in the tropical hardwood genus Terminalia (Combretaceae)［J］. *Plant Systematics and Evolution*, **200** (3-4): 225-232

Rajput K S, Rao K S, 1999. Nucleated wood fibres in some members of Combretaceae［J］. *IAWA J*, **20** (1): 79-83

Shi S H, Chang H T, Chen Y Q, *et al*, 1998. Phylogeny of the Hamamelidaceae based on the ITS sequences of nuclear ribosomal DNA［J］. *Biochem Syst Evol*, **25**: 55-69

Swofford D L, 1999. PAUP* 4.0. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods)［M］. Sunderland: Sinauer Associates

Thompson J D, Giobson T J, Plewniak F, 1997. The Clustalx windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools［J］. *Nucl Acids Res*, **25**: 4876-4882